

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1911-1912 — N° 62.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

DU CHOLÉRA

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 22 décembre 1911

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Georges EHRINGER

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né à Gray (Haute-Saône), le 15 septembre 1888



A. MALOINE, ÉDITEUR

6, RUE DE LA CHARITÉ

LYON

25, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE

PARIS

1911

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DU CHOLÉRA

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1911-1912 — N° 62.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

DU CHOLÉRA

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 22 décembre 1911

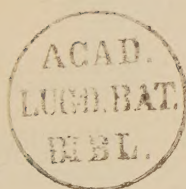
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Georges EHRINGER

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né à Gray (Haute-Saône), le 15 septembre 1888



A. MALOINE, ÉDITEUR

6, RUE DE LA CHARITÉ
LYON

25, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE
PARIS

1911

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. HUGOUNENQ. DOYEN.
COURMONT (J.) ASSESSEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CHAUVÉAU, AUGAGNEUR, MONOYER, SOULIER, TRIPIER, CAZENEUVE
LÉPINE, PIERRET.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	{	MM. TEISSIER.
Cliniques chirurgicales		ROQUE.
Clinique obstétricale et Accouchements		BARD.
Clinique ophtalmologique		PONCET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		JABOULAY.
Clinique des maladies mentales		FABRE.
Clinique des maladies des enfants		ROLLET.
Clinique des maladies des femmes		NICOLAS.
Physique médicale		X.
Chimie médicale et pharmaceutique		WEILL.
Chimie organique et Toxicologie		POLLOSSON (A.).
Matière médicale et Botanique		CLUZET.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		HUGOUNENQ.
Anatomie		MOREL.
Anatomie générale et Histologie		BEAUVISAGE.
Physiologie		GUIART.
Pathologie interne		TESTUT.
Pathologie et Thérapeutique générales		RENAUT.
Anatomie pathologique		MORAT.
Médecine opératoire		COLLET.
Médecine expérimentale et comparée		COURMONT (P.)
Médecine légale		PAVIOT.
Hygiène		POLLOSSON (M.).
Thérapeutique		X.
Pharmacologie		LACASSAGNE.
		COURMONT (J.).
		PIC.
		FLORENCE.

PROFESSEURS ADJOINTS

Physiologie, cours complémentaire	MM. DOYON.
Maladies des oreilles, du nez et du larynx	LANNOIS.
Pathologie externe	VALLAS.
Maladies des voies urinaires	ROCHET.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Chimie minérale	MM. BARRAL,	agrégé.
Propédeutique chirurgicale	BERARD,	—
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN,	—
Chirurgie infantile	NOVE-JOSSERAND,	—
Accouchements	COMMANDEUR,	—
Matière médicale	MOREAU,	—
Embryologie	REGAUD,	—
Anatomie topographique	PATEL,	—
Botanique	BRETIN,	—
Chirurgie expérimentale	VILLARD,	—
Clinique infantile	MOURIQUAND.	—

AGRÉGÉS

MM. SAMBUC,	MM. J. LEPINE.	MM. LATARJET.	MM. MOURIQUAND.
REGAUD.	LESIEUR.	BRETIN.	ARLOING (F.).
COMMANDEUR.	MARTIN (Et.).	LERICHE.	GUILLEMARD.
GAYET.	LAROYENNE.	THEVENOT.	
NEVEU-LEMAIRE.	VORON.	TAVERNIER.	
PATEL.	NOGIER.	CADE.	

M. BAYLE, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. COURMONT, *Président*; NICOLAS, *Assesseur*;
MM. LESIEUR et ARLOING, *Agrégés*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MA GRAND'MÈRE

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En remerciement de tout ce qu'ils
ont fait pour moi et en témoignage d'affection et de tendresse.

A MA SŒUR, A MON BEAU-FRÈRE

A MON FRÈRE

A MON ONCLE, LE DOCTEUR ROUGET

Médecin principal de 2^e classe,
Professeur à l'Ecole d'application du Val-de-Grâce,
Chevalier de la Légion d'honneur.

A MES PARENTS — A MES AMIS

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROCHAIX

Chef des Travaux d'hygiène
à la Faculté de Médecine de Lyon.

Il nous a apporté l'appui de son expérience et de ses conseils. Nous lui en témoignons ici notre vive et sincère gratitude.

A MES MAITRES CIVILS ET MILITAIRES

A mon Président de Thèse

M. LE PROFESSEUR J. COURMONT

Professeur d'hygiène
à la Faculté de Médecine de Lyon
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Médecin des hôpitaux
Chevalier de la Légion d'honneur

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse, qu'il nous fait aujourd'hui l'honneur de présider. Il nous a toujours accueilli avec bienveillance et n'a jamais cessé de nous prodiguer ses conseils.

De tout cela, nous le remercions en l'assurant de notre respectueuse reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Il est à peine besoin d'insister sur l'importance du diagnostic bactériologique du choléra. Comme l'a dit très justement Pottevin à l'une des dernières sessions du Comité permanent de l'Office international d'Hygiène publique, « il est devenu la clef de voûte de tout l'édifice prophylactique international ».

Le diagnostic clinique étant notoirement insuffisant dans une foule de cas, c'est sur le diagnostic bactériologique que seront basées et la déclaration des premières contaminations et la déclaration des cas ultérieurs.

Il est donc du plus haut intérêt de bien définir les méthodes employées pour la recherche et l'identification du vibrion cholérique, et surtout d'étudier et d'approfondir la valeur de chacune de ces méthodes.

Le diagnostic de choléra peut être posé, soit par la découverte dans les matières suspectes du vibrion de Koch et sa diagnose, soit par la constatation des réactions d'immunité que donne le sang d'un cholérique mis en présence du vibrion spécifique, autrement dit par le séro-diagnostic.

La première méthode comprend elle-même deux temps bien distincts :

L'isolement du vibron et son obtention en cultures pures;

Et, chose beaucoup plus difficile, son identification.

Nous examinerons donc successivement ces deux temps et, après avoir rapidement traité des moyens, classiques pour ainsi dire, employés jusqu'ici pour le diagnostic bactériologique du choléra, nous nous étendrons un peu plus longuement sur les méthodes nouvelles, lesquelles n'ont peut-être pas encore permis de résoudre le problème de la spécification du bacille virgule, mais ont tout au moins assez de valeur pratique pour autoriser le médecin à poser le diagnostic de choléra et à mettre en œuvre, le plus promptement qu'il lui sera possible, les mesures prophylactiques appropriées, d'autant plus efficaces qu'elles seront plus précoces.

CHAPITRE PREMIER

Isolement du vibrion cholérique et son obtention en cultures pures.

La recherche du vibrion spécifique dans les produits suspects (contenu intestinal, fèces, plus rarement matières vomies) est assez simple dans les manifestations cholériques présentant le syndrome gastro-intestinal classique. En effet, dans ce cas, les selles riziformes de la période aiguë sont, pour ainsi dire, des cultures pures de vibrions de Koch, et c'est alors que l'examen microscopique des produits pathologiques donne souvent des résultats suffisants, surtout si la notion d'épidémie est déjà acquise.

En délayant un peu de matière fécale dans une goutte d'eau stérilisée et en examinant de préférence à l'ultramicroscope, on aperçoit des vibrions très mobiles.

De même les préparations colorées (on choisira la fuchsine phéniquée de Ziehl étendue au 1/10, qui laisse les bacilles virgules moins vivement teintés que la plupart des microorganismes coexistant dans la préparation) ont souvent un aspect caractéristique que Koch avait bien remarqué. « S'il s'agit d'une culture pure de bacilles

cholériques, ou si ceux-ci ne sont accompagnés que du bactérium-coli, mais sont eux-mêmes en nombre supérieur, alors les bactéries cholériques sont, en règle générale, réunies aux places où la mucosité s'est disposée en filaments lors de la préparation, en groupes de forme caractéristique. En effet, elles constituent de petits amas, dans lesquels tous les bacilles ont uniformément la même direction, de sorte que l'on croirait voir une petite bande de ces bacilles se suivant à la file comme des poissons dans une eau dormante. Si dans les préparations, les groupements caractéristiques font défaut, mais si les vibrions apparaissent cependant en culture pure ou presque, on peut considérer comme extrêmement probable qu'il s'agit encore du choléra. »

Koch dit « extrêmement probable », car dans quelques cas, il peut subsister des doutes; en 1905, par exemple, on examina 2.565 échantillons de matières suspectes avec 251 résultats positifs à l'Institut des maladies infectieuses de Berlin. 33 de ces produits furent étiquetés comme cholériques sur le seul examen microscopique; mais, si 30 fois ce diagnostic fut confirmé par les recherches ultérieures, 2 fois on ne réussit pas à agglutiner les vibrions isolés et une fois il fut impossible de cultiver les vibrions découverts au microscope.

C'est également dans ces cas typiques, à la période aiguë, que l'abondance du bacille virgule dans les fèces permet l'ensemencement direct sur les divers milieux et l'obtention rapide de cultures pures.

Mais très souvent on a affaire à des individus chez lesquels la maladie en se prolongeant a permis aux autres bactéries intestinales de se développer de plus en plus,

au point même de rendre difficilement décelable le vibron spécifique, ou bien à des atteintes bénignes ou atypiques, ou surtout à ces porteurs sains de germes, dont l'importance au point de vue prophylactique est de jour en jour plus démontrée dans les travaux modernes sur l'épidémiologie du choléra.

Dans tous ces cas, l'examen microscopique et l'ensemencement direct ne donneront rien. Il faudra avoir recours aux cultures d'enrichissement.

Ces dernières se ramènent essentiellement à l'emploi de l'eau peptonée dans laquelle on ensemence 1 cc. de matières suspectes, quelquefois 5 cc. et rarement une quantité supérieure pouvant aller jusqu'à une anse intestinale complète dans un litre d'eau peptonée.

Ce milieu peut se préparer de différentes manières, soit d'après la formule donnée par l'Instruction allemande du 21 mars 1907 :

Peptone de Witte sèche	100 gr.
Sel marin.	100 —
Nitrate de potasse	1 —
Carbonate de soude cristallisé . . .	2 —
Eau distillée q. s. pour	1 litre.

soit d'après la formule de Metchnikoff :

Peptone sèche.	1 gr.
Sel marin.	0 gr. 50.
Gélatine	2 —
Eau distillée q. s. pour	100 ^{cc}
Alcaliniser légèrement à la soude.	

Au point de vue pratique, on a avantage à remplacer les solutions de peptone du commerce par celles que l'on obtient en faisant macérer des estomacs de porc dans une dilution d'acide chlorhydrique à 5 p. 1.000.

On peut effectuer des prises dès la troisième heure, mais c'est surtout de la sixième à la douzième heure que le vibron domine dans la culture; passé ce délai, les autres bactéries des fèces se développent de plus en plus et gênent par suite l'isolement du bacille virgule. Le plus simple d'ailleurs est de faire de temps en temps des prélèvements, de façon à se rendre compte du moment où domine le vibron cholérique.

On assure l'isolement de ce dernier en ensemençant divers milieux à partir des prises faites sur les cultures d'enrichissement.

Le plus anciennement employé fut la gélatine, soit en plaques, soit en tubes, sur laquelle les colonies apparaissent vers la vingtième heure sous un aspect spécial, mais insuffisamment caractéristique pour servir au diagnostic.

Puis, à la gélatine, succéda la gélose qui, dans un temps beaucoup plus court, puisqu'il suffit de six à huit heures d'étuve à 37°, donnent des colonies utilisables. Pour réussir, il faut l'alcaliniser en ajoutant par exemple à 100 cc. de milieu neutre 3 cc. d'une solution de soude à 10 p. 100.

Aujourd'hui, on recherche de plus en plus ce que les bactériologistes appellent des milieux électifs, c'est-à-dire sur lesquels le vibron cholérique pousse en beaucoup plus grande abondance et beaucoup plus rapidement que les autres microorganismes des fèces.

Dès 1893, Deycke avait préconisé, mais sans succès, une solution d'alcali-gélatine contenant 0,75 p. 100 de soude.

En 1902, Crendiropoulo et M^{me} Panayotatou ont créé un milieu permettant d'éliminer le B. pyocyanique, dont

l'abondance causait souvent à leurs recherches des obstacles insurmontables. Après quelques tâtonnements, ils se sont arrêtés au mode opératoire suivant : on ajoute 10 cc. de soude caustique à 10 p. 100 à une solution de 5 gr. de peptone dans 190 cc. d'eau et on chauffe trois à cinq minutes. On laisse refroidir, on filtre sur papier et on chauffe à 100° pendant une demi-heure. Pour s'en servir, on mêle 4 parties de la préparation précédente à 6 parties d'agar peptoné neutre :

Agar-agar	3 gr.
Peptone.	1 —
Sel marin.	0 gr. 50.
Eau	q. s. pour 100 ^{cc} .

Sur le milieu ainsi obtenu, on peut utiliser dès la dix-huitième heure les colonies de vibrions cholériques alors que le B. pyocyanique ne pousse guère que vers la trentesixième heure.

Enfin, en 1909, Dieudonné a composé une formule qui a marqué un véritable perfectionnement dans l'isolement du bacille virgule, et sur lequel nous nous étendrons un peu plus longuement, étant donné l'emploi considérable qui en a été fait lors de la dernière épidémie, en Italie notamment. L'auteur prépare, avec parties égales de sang de bœuf défibriné et de solution normale de potasse, un liquide A qu'il stérilise à l'autoclave. Il mélange 3 parties de ce liquide avec 7 parties d'un liquide B, qui n'est autre que de la gélose nutritive rigoureusement neutre, et coule en plaques.

Le milieu ainsi composé possède alors une alcalinité correspondant à environ 0,6 p. 100 de potasse. Cette réduction de l'alcalinité primitive est due au chauffage du

mélange A pendant lequel une partie de la potasse est saturée par les albuminoïdes du sang ou les corps résultant de leur hydrolyse.

Les propriétés spéciales de ce milieu sont dues non seulement à la potasse demeurée libre, mais aussi aux albuminates alcalins dont nous venons de parler. En effet, de la gélose nutritive que l'on a rendue alcaline au même titre ou de la gélose alcaline à laquelle on ajoute après coup le sang défibriné ne donnent pas du tout les mêmes résultats que le mélange préparé selon la formule de l'auteur. De même, on verra disparaître ses propriétés spéciales si on diminue la quantité de potasse de la liqueur A, tout en conservant le même mode opératoire.

Avant de pouvoir utiliser les plaques, on doit obtenir une sorte de maturation du milieu, en les maintenant quelques jours à l'étuve à 37°, la face en bas et découvertes, ou 48 heures à la température du laboratoire, ou encore en les chauffant cinq minutes à 65°. La surface des plaques se dessèche légèrement, par suite de l'évaporation de l'ammoniaque formé par le chauffage du mélange sang-potasse, et perd un peu de son alcalinité.

Les plaques ayant subi l'une ou l'autre de ces opérations doivent être utilisées dans un délai maximum de cinq à six jours.

Pour remédier à la perte de temps causée par les manipulations précédentes, Neufeld et Woithe préconisent un milieu susceptible d'être employé dès sa préparation en ajoutant à 10 cc. d'agar-sang 0 cc. 2 d'une solution à 10 p. 100 d'acide lactique. Par contre, ce dernier milieu ne conserve ses qualités électives que vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Sur gélose de Dieudonné, l'ensemencement en stries donne rapidement (douze heures) des colonies abondantes de vibrions cholériques, alors que les *B. coli*, typhiques, paratyphiques, dysentériques, etc., poussent mal ou pas du tout.

Comme nous le verrons plus loin, le milieu de Dieudonné, très utile pour l'isolement du bacille virgule, ne peut suffire au diagnostic, car certaines espèces se développent sur lui avec la même énergie que le vibron de Koch.

Quant aux milieux liquides obtenus en mélangeant 3 parties de la solution alcaline de sang avec 7 de bouillon ou d'eau peptonée neutre, les résultats ne sont pas meilleurs qu'avec l'eau peptonée ordinaire.

Les cultures d'enrichissement dont nous avons parlé au début de ce chapitre doivent être systématiquement pratiquées au début de tout examen de matières suspectes. Cependant si l'examen microscopique direct de sels riziformes, par exemple, a montré le vibron cholérique en abondance, on peut ensemençer immédiatement des parcelles de matières fécales sur les milieux d'isolement : gélatine, gélose ou agar-sang alcalin.

CHAPITRE II

Identification du vibrion cholérique par les caractères morphologiques, bio-chimiques et d'inoculation.

A l'aide de l'un ou l'autre des procédés énumérés dans le chapitre précédent, nous avons obtenu une culture pure que nous supposons être une culture de vibrion cholérique. Comment allons-nous réussir à identifier ce vibrion, à poser en un mot le diagnostic de choléra ? Ici, nous touchons à un des problèmes les plus difficiles de la bactériologie, pour lequel on a proposé déjà de nombreuses solutions. Aucune de ces solutions, jusqu'à présent, n'est satisfaisante, car si les réactions d'immunité que nous étudierons à la fin de ce travail sont suffisantes dans la pratique, elles laissent encore subsister bien des doutes au point de vue théorique et scientifique pur.

Nous allons donc passer rapidement en revue les différents moyens classiques, pour ainsi dire, utilisés pour le diagnostic du vibrion cholérique; après avoir montré leurs défauts, nous nous occuperons des méthodes nouvelles employées depuis quelques années et basées sur les réactions d'immunité.

Tout d'abord, on ne peut se fier à la morphologie du

bacille virgule, pour le déterminer; car, si un caractère est variable chez les bactéries en général et chez le vibron cholérique en particulier, c'est bien la forme. Koch a bien décrit ce dernier comme une bactérie large de $0\ \mu 5$ et longue de $1\ \mu 5$ à $2\ \mu$, en fragment d'hélice, dont la projection sur le plan de la lamelle donne une sorte de virgule, pouvant présenter, par la disposition bout à bout d'un certain nombre d'individus, l'aspect d'un spirille, très mobile, avec un cil unique à l'une de ses extrémités.

Or, on trouve nombre de vibrions cholériques ayant les caractères précédents plus ou moins accentués ou même s'en écartant complètement. On a affaire, alors, à des bâtonnets droits, longs ou ovoïdes, ou même à de véritables cocci. Certains sont polyciliés, d'autres tout à fait immobiles.

De même les caractères de coloration sont communs au vibron cholérique et à une foule d'autres bactéries de la même famille, comme les vibrions des eaux, par exemple.

On s'est alors adressé aux cultures pour essayer d'y trouver des caractères permettant d'affirmer la présence du bacille du choléra.

Longtemps on a cru trouver un critérium dans les cultures sur gélatine, qui, en effet, ont une apparence assez spéciale : si l'on examine une plaque de gélatine qui vient de passer vingt-quatre heures à l'étuve à 22° , on remarque de petits disques opalescents, légèrement granuleux à leur surface et à contours sinueux; le lendemain, le disque, plus clair, a gagné en épaisseur et en superficie; ses bords sont dentelés, sa surface, toujours granuleuse, est plus brillante et donne l'impression d'une masse de

petites perles de verre. Puis, par liquéfaction de la gélatine, on a une dépression en cupule pleine de liquide limpide et au fond de laquelle on aperçoit la colonie. En cinq ou six jours, la liquéfaction a gagné toute la plaque qui répand alors une odeur « d'urine de souris ».

Malheureusement, à côté de ces colonies dont l'aspect est bien tranché, assez souvent, il en est d'autres qui sont troubles, à contours irréguliers, en un mot n'ayant rien de caractéristique. Et de plus de nombreuses espèces microbiennes, habitant les eaux en particulier, fournissent des cultures ressemblant parfaitement à celles décrites plus haut.

La gélose donne des colonies, en forme de disques plats, transparents et gris bleuté, assez difficiles à apercevoir au milieu des autres colonies développées sur la même plaque. Le milieu de Dieudonné ne peut servir non plus de moyen de diagnostic; en effet, non seulement les colonies de bacille virgule obtenues avec lui sont peu caractéristiques, malgré leur transparence, leur teinte grise et leur surface luisante à la lumière réfléchie, mais encore le bacillus proteus, le bacille pyocyanique, la plupart des vibrions des eaux, etc., se développent sur l'agar-sang avec autant d'intensité et de rapidité que le vibrion cholérique.

Ne pouvant obtenir de renseignements certains d'après l'aspect des colonies, on s'est tourné vers d'autres caractères cultureux.

En 1886, Poehl et, simultanément, Bujwid et Durham en 1887, découvrirent la réaction du rouge-choléra consistant dans l'apparition d'une coloration rose violette au sein d'une culture pure de vibrions cholériques addition-

née de 5 à 10 p. 100 d'acide chlorhydrique ou sulfurique pur. La coloration résulte de l'action de l'acide sur l'indol et l'acide azoteux formés antérieurement dans les cultures. Ali Cohen a attiré l'attention sur la cause d'erreur provenant de l'impureté fréquente des acides minéraux, qui peuvent renfermer de l'acide azoteux. Par suite, tous les microbes fabriquant de l'indol sont capables de donner la réaction si l'on verse dans leurs cultures quelques gouttes de ces acides impurs.

Koch et Durham reprennent la question et prouvent que le vibrion cholérique seul produit à la fois de l'indol et de l'acide azoteux.

Ainsi, pour que la réaction soit probante, il convient d'opérer sur des cultures pures, en eau peptonée, additionnée d'un peu de nitrate de potasse et non en bouillon peptoné et de n'employer que de l'acide sulfurique absolument pur.

Le choléra-roth semblait avoir ainsi repris toute sa valeur, lorsqu'en 1908-1909, sur 558 vibrions cholériques bien caractérisés, 55, soit près de 10 p. 100, ne donnaient pas le rouge-choléra. La proportion était de 20 p. 100 avec des vibrions spécifiques provenant des eaux. De plus le rouge-choléra peut être produit avec des cultures du *Vibrio Metchnikowii*.

En 1902, Chantemesse propose d'appliquer au choléra le gélo-diagnostic découvert par lui pour le bacille d'Eberth. Il ensemence une petite quantité de matières, fraîches autant que possible, dans un tube assez large contenant 10 cc. d'eau peptonée neutre à 3 p. 100. Après avoir maintenu cette culture six ou sept heures à 37°, il filtre sur papier et ajoute au liquide qui a traversé le pa-

pier deux à trois gouttes de sérum anticholérique agglutinant. Il attend un quart d'heure et centrifuge alors pendant cinq minutes. Il décante et après avoir délayé le culot dans un peu d'eau stérilisée, il le filtre à nouveau et, avec un bouchon de carafe en verre, à extrémité aplatie, il tamponne énergiquement le résidu fixé au papier et porte successivement le bouchon chargé de vibrions sur des plaques de gélose.

Ce procédé, trop compliqué pour être appliqué à tous les cas d'une épidémie, ne fait d'ailleurs que reculer la difficulté, puisqu'il se base en somme et en dernier lieu sur les caractères des cultures du vibrion cholérique sur gélose.

En 1904, Mavrojanis propose, pour différencier le vibrion de Koch de celui de Metchnikoff et de celui de Finkler Prior, de se baser sur la façon différente dont chacun de ces microbes liquéfie la gélatine : la liquéfaction est complète par le premier; la gélatine peut, d'ailleurs, être resolidifiée par l'addition de formol, qui est sans action sur la gélatine liquéfiée par les deux autres. Ce procédé présente le grave inconvénient d'exiger beaucoup trop de temps pour un diagnostic rapide. Aux dix jours que doivent présenter comme âge les cultures, il faut ajouter dix ou douze jours nécessaires au formol pour manifester son action.

Kraus, en 1904 également, base la diagnose du vibrion cholérique sur le pouvoir hémolytique faible de ce dernier en comparaison de la puissance destructive des pseudo-cholériques vis-à-vis des globules rouges. Il liquéfie des tubes d'agar, les laisse refroidir jusqu'à 40° et ajoute alors à chacun d'eux 0 cc. 3 à 0 cc. 5 de sang défibriné

de chèvre ou de mouton; il mélange, coule en plaque et ensemence. Si le vibron est hémolysant, au bout de vingt-quatre heures d'étuve, on observe une auréole claire autour des colonies.

Ce procédé ne peut servir encore de moyen d'identification. Le pouvoir hémolytique d'un vibron est sujet, dans la même espèce, aux mêmes variations que les autres propriétés biologiques des microbes. De plus, les résultats sont tout à fait différents si on prolonge le séjour à l'étuve au delà de vingt-quatre heures.

Huntemuller, par exemple, examinant 55 espèces, en trouve 6 donnant l'hémolyse en laissant vingt-quatre heures les plaques à l'étuve. Au bout de six jours d'étuve, il en trouve 35 donnant l'auréole hémolytique. Dans ce cas de séjour prolongé à l'étuve, il faut peut-être faire intervenir, comme agent d'hémolyse, l'ammoniaque formé dans la culture sous l'influence de la chaleur, ce qui est encore une cause d'erreurs.

Enfin, les vibrions cholériques vrais sont capables de produire l'hémolyse et, à Saint-Pétersbourg, sur 642 vibrions isolés récemment, 406 donnaient cette réaction d'une façon suffisamment sensible.

Devant le peu de valeur de toutes ces réactions, de toutes ces méthodes, les bactériologistes se sont alors tournés vers les animaux de laboratoire et ont recherché si, d'après les résultats des inoculations faites à ces derniers, on ne pourrait pas préjuger de la nature du bacille employé. Mais là encore on n'a pu trouver de réaction réellement spécifique, permettant d'affirmer qu'on est en présence d'un vibron cholérique. Le bacille virgule en injection dans le péritoine d'un cobaye devrait à coup sûr tuer

cet animal. Il n'en est rien. Des vibrions banaux se sont montrés dans certains cas d'une virulence énorme, alors que des vibrions cholériques authentiques ont été tout à fait inactifs.

Les mêmes reproches peuvent être faits à la méthode qui déclare cholériques les bactéries qui, en injection intra-péritonéale, tuent le cobaye sain et laissent intact le cobaye auquel on a fait préalablement une injection de sérum anticholérique.

En injection intra-musculaire chez le pigeon, le vibrion cholérique est pathogène pour ce dernier, à l'inverse de la plupart des vibrions ordinaires, proposition généralement vraie, mais non toujours.

Enfin, si l'on fait ingérer au jeune lapin, non encore sevré, ou au spermophile, quelques gouttes d'une culture de vibrions cholériques seuls, ces animaux contractent un choléra intestinal rappelant le choléra humain. Mais la proportion des animaux malades est de 50 p. 100 seulement. Si l'on ajoute des microbes favorisants, on élève la proportion à 90 p. 100 pour le jeune lapin, mais jamais on n'atteint la proportion de 100 p. 100 qui permettrait le diagnostic. Même si cette proportion existait, il y aurait encore des doutes, car il n'y a aucune expérience servant de contre-épreuve et démontrant que des vibrions vulgaires donnés « per os » aux animaux envisagés ne sont pas capables de faire naître chez eux une diarrhée cholériforme.

En dernier lieu, l'emploi systématique des animaux pendant une épidémie est pratiquement irréalisable, étant donné que souvent le bactériologiste devra opérer dans des laboratoires de fortune où l'appvisionnement en animaux pourra difficilement avoir lieu.

CHAPITRE III

Identification du vibron cholérique par les réactions d'immunité.

Les différents travaux de Pfeiffer et Isaëff, de Gruber et Durham, de Bordet appliquant aux recherches bactériologiques les ressources fécondes des réactions d'immunité, permirent à Dunbar d'abord, mais surtout à Kolle et Gotschlich en 1903, d'éclairer d'un jour nouveau la question de la spécification du vibron de Koch.

Avant de rapporter leurs expériences et les conclusions qu'elles leur ont permis de formuler, nous allons examiner leur technique opératoire qui, d'ailleurs, a été adoptée à quelques variantes près, par toutes les puissances adhérentes à l'Office International d'Hygiène publique.

Les réactions connues sous le nom de réactions d'immunité sont au nombre de deux :

La réaction d'agglutination;

La réaction de Pfeiffer ou de bactériolyse.

Toutes deux sont basées sur l'action spécifique sur un vibron du sérum d'un animal immunisé contre ce vibron, action qui se traduit par l'immobilisation de ce microbe, son agglutination et enfin sa désintégration.

Réaction d'agglutination. — On sait que le sérum nor-

mal des animaux possède toujours un pouvoir d'agglutination plus ou moins marqué vis-à-vis des microbes et qui pourra être une cause d'erreur. Aussi, pour obtenir le sérum agglutinant dont on aura besoin pour les recherches ultérieures, devra-t-on s'adresser aux animaux dont le sérum possède une puissance agglutinante faible : le lapin, par exemple. Cependant, lorsque le bactériologiste aura besoin de grandes quantités de sérum, des raisons d'ordre pratique lui conseilleront de s'adresser au cheval, dont, malheureusement, le sérum normal est très agglutinant.

Ceci dit, on immunise un lapin en lui injectant à trois reprises, par voie intraveineuse et à sept jours d'intervalle des quantités croissantes (1, 3, 5 ccs) de cultures tuées par chauffage pendant une heure à 60°. Sept jours après la dernière injection, une saignée donnera des sérums fortement agglutinants.

On recherchera immédiatement le titre agglutinatif de ce sérum, c'est-à-dire le titre de la dilution dans l'eau physiologique dont 1 cc. agglutine complètement en deux heures, à la température de 37°, 1 ccs de culture de vibrions sur gélose ayant dix-huit heures de séjour à l'étuve à 37°. Le titre agglutinatif du sérum conservé liquide peut varier dans des proportions assez grandes. Si l'on dessèche le sérum dans le vide et qu'on le garde ainsi en tubes scellés, à l'abri de la lumière, son titre agglutinatif restera à peu près constant.

Avec un sérum dont le titre agglutinant sera de préférence égal ou supérieur à 1/4000, le bactériologiste pratiquera des essais préliminaires sur les colonies en milieux solides pour avoir une indication sur leur nature,

et des essais définitifs, c'est-à-dire l'identification du vibron suspect par l'évaluation exacte de l'activité de l'immun-sérum vis-à-vis de lui.

Pour un essai préliminaire, on emploiera des doses de sérum assez fortes, une dilution à 1/500 par exemple, si son titre agglutinatif est de 1/5000, et si l'on veut avoir rapidement des données précises. On prend une goutte de cette dilution et on y délaye une petite quantité de la culture à examiner. Au bout de trente minutes au plus, à l'œil nu, ou mieux, au microscope avec un faible grossissement, on apercevra un liquide clair avec un réseau de vibrions agglutinés. Il sera toujours prudent de délayer également un peu de culture dans une goutte d'eau physiologique qui devra garder un aspect uniformément trouble. En effet, les colonies jeunes de vibrions, comme aussi celles de nombreuses autres races microbiennes, se délayent mal et donnent ainsi l'aspect d'une pseudo-agglutination. La conclusion à tirer si le phénomène est net, est que le vibron est à peu près sûrement cholérique; sinon on doit réserver son jugement.

Pour un essai définitif, on prépare des dilutions très limpides, que l'on filtre au besoin, d'immun-sérum dans l'eau physiologique à des titres de plus en plus forts, 1/200, 1/500, 1/1000, etc., etc., et on verse 1 cc. de chaque dans autant de petits tubes qu'on a préparé de dilutions. On ajoute à chacun une cœse d'une culture de dix-huit heures sur gélose et on met deux heures à l'étuve à 37°. Au bout de ce temps, on aura une réaction positive dans tout tube au fond duquel on apercevra des grumeaux formés de vibrions agglutinés, laissant au-dessus d'eux un liquide absolument clair.

On fait en même temps deux autres essais : l'un avec la culture suspecte et le sérum normal de l'espèce animale qui a fourni l'immun-sérum; l'autre avec cet immun-sérum et un vibron cholérique authentique. Si l'on emploie des cultures jeunes, on se rappellera ce qui a été dit plus haut à leur sujet.

Il est bien entendu que pour avoir toute sa valeur, la recherche doit porter sur des cultures pures, sinon avec des cultures contenant d'autres espèces bactériennes on n'observera aucun phénomène appréciable.

Dunbar effectue l'essai préliminaire sur les produits pathologiques eux-mêmes. Il dépose sur deux lamelles deux gouttes, l'une d'immun-sérum à 1/500, l'autre de sérum normal de même espèce à 1/50, après avoir dilué dans chacune une petite quantité de matières fécales, par exemple, et il renverse le tout sur une lame creuse pour l'examen. Si, comme cela arrive souvent, la parcelle suspecte provient de cultures presque pures (selles riziformes), en cinq minutes en moyenne, on voit au microscope dans le sérum normal des vibrions très mobiles, tandis que dans l'autre, ils sont complètement immobiles et subissent même un commencement d'agglutination. Ici encore, si la flore microbienne des matières utilisées est très variée, il ne faut compter retirer aucune indication nette de l'essai.

Bandi prépare une solution de peptone et de sel marin à 1 p. 100 et y ajoute du sérum anticholérique en quantité telle que le titre agglutinant du mélange ne soit à peu près que la moitié de celui de l'immun-sérum employé. Il verse 5 cc. de ce milieu dans des petits tubes se terminant vers le bas en une pointe effilée et met à l'étuve à 37° après

ensemencement. Si on a affaire à des vibrions cholériques ceux-ci se développent dans l'eau peptonée, s'agglutinent et tombent dans la partie inférieure du tube. En un temps variant de deux à sept heures, on peut avoir une culture agglutinée très nette. Cette méthode est passible des mêmes reproches que la précédente, si l'on est en présence d'une flore assez complexe.

Réaction de Pfeiffer. — Cette réaction peut se faire de deux manières : par le procédé de Pfeiffer ou par celui de Bordet.

Pfeiffer obtient un sérum bactériolytique en injectant en une seule fois, dans le péritoine de l'animal choisi, la culture entière d'un tube de gélose tuée par chauffage d'une heure à 56°; il recueille le sang quatorze jours après. Pour les raisons données déjà au sujet de la réaction d'agglutination, on choisit le lapin qui donne en moyenne 40 cc. de sérum.

On mesure le titre bactériolytique obtenu, c'est-à-dire celui de la dilution faite dans du bouillon de viande dont 1 cc. additionné d'une anse de culture cholérique sur gélose ayant dix-huit heures d'étuve à 37°, virulente, injecté dans le péritoine d'un cobaye assure en une heure la dissolution après transformation en granules de la presque totalité des vibrions.

Le sérum employé pour la réaction de Pfeiffer doit avoir au moins un titre bactériolytique égal à 1/5000 pour éliminer autant que possible l'action des produits bactériolytiques normaux du sérum.

On prend alors trois cobayes de 200 grammes environ : au premier, A, on injecte dans le péritoine un liquide composé de 1 cc. de macération de viande, dans lequel

on délaye une anse de culture suspecte, de dix heures, sur gélose et auquel on ajoute cinq fois la quantité de sérum qui donnerait une dilution au titre limite (c'est-à-dire 1 millim. cube s'il est actif au 1/5000). Au deuxième, B, on injecte une anse de la même culture délayée dans 1 cc. de macération de viande, mais sans sérum. Le troisième, C, reçoit la même dilution et en plus une dose de sérum normal égalant dix fois la quantité de sérum anticholérique administrée à A. Vingt minutes après, on peut prélever du liquide péritonéal qu'on examine en goutte pendante avec un fort grossissement. On a une réaction positive si dans un temps variant de vingt minutes à une heure au plus on trouve des vibrions dissous ou transformés en granules dans le péritoine du cobaye A, alors que le liquide péritonéal des cobayes B et C renferme des vibrions normaux et mobiles. Une des conditions indispensables est que le vibrion à essayer possède une virulence suffisante pour le cobaye, en injection intra-péritonéale, sinon il se dissout chez B et C aussi bien que chez A.

Le procédé de Bordet a sur le précédent l'avantage de ne pas exiger d'animaux et, par suite, est plus applicable dans les laboratoires improvisés dont nous avons déjà parlé dans un précédent chapitre.

Ce bactériologiste, partant d'une solution mère au 1/50 de sérum anticholérique, prépare une série de dilutions en versant dans un certain nombre de tubes : a) cinq gouttes de sérum de cobaye qui représente l'alexine; b) cinq gouttes d'une émulsion microbienne, faite avec une anse de culture sur agar ayant dix-huit heures d'étuve, dans 1 cc. d'eau physiologique; c) le nombre de gouttes de la solution mère nécessaires pour arriver au titre voulu de

la dilution, c'est-à-dire en général 1/100, 1/500, 1/1000;
d) le nombre de gouttes d'eau physiologique nécessaires pour atteindre le volume de vingt gouttes.

On opère de la même manière sur un certain nombre d'autres tubes en remplaçant l'immun-sérum par du sérum normal. On porte à l'étuve à 37°, et au bout de trois ou quatre heures on examine en goutte pendant ou en préparations colorées. On fait les mêmes constatations que dans la réaction de Pfeiffer et, de plus, au bout de dix-huit heures d'étuve, dans tous les tubes à sérum normal les vibrions sont restés mobiles, alors que dans tout ou partie des tubes à immun-sérum les vibrions sont plus ou moins dissous.

Afin d'éviter toute hésitation, on répète la même opération avec le vibron suspect et avec un vibron authentique. De plus, pour Crendiropoulo et M^{me} Panayotatou, il est prudent d'utiliser quatre tubes, A, B, C, D, dans lesquels on met respectivement pour le même volume total de liquide :

Dans A, la même quantité de microbes, plus la plus grande partie de sérum spécifique employé, sans alexine;

Dans B, la même quantité de microbes, plus la plus grande partie de sérum normal employé, sans alexine;

Dans C, la même quantité de microbes, plus la quantité d'alexine employée, sans sérum.

Dans D, la même quantité de microbes, plus de l'eau physiologique.

Maintenant que nous avons fait connaître la technique employée dans ce genre de recherches, voyons quelles ont été les expériences de Kolle et Gotschlich, qui ont permis d'affirmer la grande valeur pratique des deux sortes de réactions envisagées plus haut.

Les travaux de ces deux auteurs ont porté sur 87 espèces vibronniennes, dont 77 avaient été isolées à Alexandrie pendant l'épidémie de 1902, tant chez des malades que chez des gens soupçonnés d'une atteinte cholérique. Parmi ces 77, 4 étaient des races bien caractérisées de vibron de Koch, dont l'un même (vibron de Pfeiffer) avait donné lieu à une infection accidentelle présentant tous les symptômes d'un choléra confirmé et des plus sérieux. Deux autres étaient des vibriens para-cholériques à identification certaine (vibron de Metchnikoff et vibron de Nordhafen). L'immun-sérum fut obtenu par inoculation au lapin du vibron de Pfeiffer cité ci-dessus et voici quels furent les résultats de ces recherches.

Le sérum normal était incapable de causer la moindre agglutination sauf à doses élevées et dans ce cas à peu près égales pour tous les vibriens envisagés.

Le sérum spécifique, au contraire, agglutinait tous les vibriens, mais à des dilutions tellement variables, que l'on put immédiatement classer les espèces en deux catégories bien distinctes :

Dans un premier groupe, A, prenaient place des vibriens dont l'agglutination n'était obtenue qu'au moyen de doses de sérum aussi élevées que si l'on s'était adressé à du sérum normal, c'est-à-dire 1/20 à 1/50. De plus aucun ne donnait la réaction de Pfeiffer et si quelques-uns présentaient les caractères généraux du vibron de Koch, d'autres en différaient à peu près totalement.

Dans un deuxième groupe, B, au contraire, se rencontraient des bacilles virgules agglutinables à des dilutions d'un ordre variant du 1/1000 au 1/20000, monociliés, présentant les caractères du vibron décrit par Koch. La

réaction de Pfeiffer, tout au moins dans les cas où elle put être tentée, fut toujours positive.

On procéda alors à des contre-épreuves. On immunisa un lapin avec un vibron du groupe A et l'on remarqua que le sérum ainsi obtenu n'agglutinait guère que le vibron qui avait servi à sa fabrication ou exceptionnellement un ou deux autres. Par contre, si l'on utilisait pour inoculer l'animal un vibron du groupe B, le sérum spécifique auquel il donnait naissance était peu actif, il est vrai, envers les vibrions de la catégorie A, mais il agglutinait tous ceux de la catégorie B.

On répéta les expériences avec d'autres animaux, chèvre, âne, bœuf, etc., et toujours on obtint des résultats superposables, comme le témoigne le tableau suivant :

Tableau I

Titre agglutinatif maximum observé pour le sérum normal ou l'immun sérum de diverses espèces animales vis-à-vis des vibrions des groupes A et B. L'immunisation étant faite dans tous les cas avec le vibron Pfeiffer.

	CHÈVRE		ÂNE		CHEVAL		LAPIN		BOEUF	
	SN	SI	SN	SI	SN	SI	SN	SI	SN	SI
Groupe A..	200	200	50	100	200	200	50	50	50	?
— B..	50	2000	20	5000	200	2000	20	20000	50	?

L'opinion qui se dégage de faits aussi caractéristiques est que les vibrions de la classe B appartiennent tous à une seule et même espèce, celle du vibron cholérique.

Si l'on nous objecte que Koch et Gotschlich n'ont expérimenté que sur 87 races de vibrions, ce qui n'est pas suffisant pour émettre une proposition aussi absolue,

nous répondrons que depuis 1905 des essais dans le même sens ont porté sur des milliers de cas et que toujours la conclusion énoncée plus haut a été confirmée, à savoir :

1° Les réactions d'agglutination et de Pfeiffer concordent toujours;

2° Si un vibrion réagit positivement à l'action d'un immun-sérum, il fournira lui aussi un sérum actif pour les vibrions de la même espèce et uniquement pour ceux-là.

Cela est si vrai que la conception de Kolle et Gotschlich est désormais la base du diagnostic bactériologique du choléra, non seulement dans les laboratoires privés de recherches scientifiques, mais aussi dans les laboratoires officiels des administrations sanitaires.

La conséquence pratique immédiate est que dans tous les cas de choléra typique se produisant en temps d'épidémie, les vibrions cholériques ne feront jamais défaut. S'il est de ces cas où des analyses répétées, portant sur les produits pathologiques de la période aiguë, ne les aient pas fait découvrir, « on peut considérer, dit M. Pottevin, que leur nombre ne dépasse pas le taux des insuccès sur lesquels il faut toujours compter avec les méthodes de recherches bactériologiques, même les plus sûres ».

Chez l'homme sain on rencontrera d'autant plus souvent les vibrions à réaction positive que l'homme examiné aura eu plus de chances d'être contaminé. Dans le milieu extérieur, les mêmes vibrions n'ont été rencontrés que dans des endroits où la souillure par des déjections cholériques était certaine ou tout au moins probable.

La découverte de l'agglutino-réaction qui, pratiquement, est de beaucoup la plus commode, nous met donc

en possession d'une méthode de diagnostic rapide et d'une valeur telle, que tous les bactériologistes sont d'accord pour l'employer aujourd'hui.

Malheureusement, tous les gouvernements n'ont pas adopté comme critérium un taux identique pour les dilutions, d'où des divergences fâcheuses.

L'Allemagne, par exemple, dans le règlement de 1907, déclare que : l'épreuve de l'agglutination doit être considérée comme positive et permet de regarder comme cholérique la culture soumise à l'essai lorsqu'il s'est produit une agglutination nette jusqu'aux dilutions atteignant la limite du titre de l'immun-sérum utilisé.

Le gouvernement italien a adopté la même manière de voir.

Par contre, dans les circulaires adressées par le Ministère de l'Intérieur français aux laboratoires intéressés, il est dit que : sera déclaré cholérique tout vibron agglutiné au 1/2000 par un sérum dont l'activité est d'environ 1/4000.

Il semble bien que les conditions exigées par l'Allemagne et l'Italie soient trop sévères et laisseront sûrement étiqueter vibrions banaux des vibrions cholériques. Il suffit de jeter un coup d'œil sur le tableau ci-dessous, résumant les expériences de Kolle et Gotschlich sur les vibrions du groupe B :

On voit de suite que pour un sérum donné les vibrions ne sont pas tous sensibles au même degré et que, d'ailleurs, leur ordre de sensibilité varie avec le sérum employé; il arrive même que le plus agglutinable n'est pas celui qui a servi à l'obtention du sérum utilisé.

Un exemple fera mieux saisir les erreurs auxquelles peut aboutir le choix de la dilution limite comme critérium : prenons le sérum XII, si nous le titrons avec l'un des vibrions qui sont agglutinés par lui au 1/20000, l'un II entre autres, nous ne pourrions considérer comme cholériques que les vibrions agglutinés au titre limite, c'est-à-dire au 1/20000 et seuls I, II, XXVI, XXVII, XXIX seront des bacilles virgules, mais les vibrions VI, VII, XI, etc., qui n'agglutinent qu'au 1/10000, ne le seront pas, et, chose plus bizarre, le vibron XII, qui aura fourni le sérum, n'est agglutiné qu'à 1/1000, donc sera loin d'être spécifique.

Enfin, une autre cause d'erreur réside dans l'existence du coefficient personnel, de telle sorte qu'une dilution sera titre limite pour un observateur alors que pour un autre ce critérium sera représenté par une dilution plus forte.

D'après les expériences de Kolle et Gotschlich, de même que d'après les recherches effectuées ultérieurement, il semble bien qu'il faille être moins exigeant et tenir pour cholérique tout vibron agglutiné au moins au 1/1000 par un sérum actif à 1/4000. Les vibrions vulgaires agglutinent en général au 1/50, rarement à 1/200 et tout à fait exceptionnellement à 1/500. Si l'espèce suspecte donne la réaction avec des dilutions variant de 1/500 à 1/1000, l'épreuve doit être considérée comme douteuse.

Pour la réaction de Pfeiffer, lorsqu'on peut y recourir, et de Bordet, dans le cas contraire, on devra s'en tenir aux indications données plus haut dans la technique opératoire.

CHAPITRE IV

Valeur des réactions d'immunité au point de vue de l'identification absolue du vibrion cholérique.

On vient de voir quelle était la haute valeur diagnostique des réactions d'immunité au point de vue pratique. Il serait intéressant d'examiner si elles permettent de résoudre le problème si controversé de la spécification du vibrion cholérique.

Autrement dit :

1° On trouve dans des produits pathologiques des vibrions ne donnant ni l'agglutino-réaction, ni le phénomène de Pfeiffer. Ils sont cependant en telle abondance, qu'immédiatement vient à l'esprit l'idée d'une infection vibrionienne. Doit-on, étant données leurs réactions négatives, exclure complètement le diagnostic de choléra ?

2° Les vibrions présentant les caractères qu'a décrits Koch, donnant les réactions d'immunité, sont-ils tous pathogènes au même titre, et doivent-ils être étiquetés tous sous le nom de vibrions cholériques ?

Nous étudierons successivement ces deux questions.

De tout temps, les médecins se sont accordés pour reconnaître, en temps d'épidémie cholérique, l'existence de

diarrhées, dont il était impossible d'affirmer la spécificité et qui dégénéraient souvent en attaques de choléra typiques.

Ces diarrhées, à diagnostic incertain, sont devenues de moins en moins fréquentes avec les progrès des recherches bactériologiques. Elles ont fait rentrer, en effet, dans la catégorie des diarrhées spécifiques la plupart des malaises prémonitoires, classés autrefois comme gastro-entérites, comme l'a très bien fait remarquer M. Gaffky au sujet de l'épidémie de Hambourg en 1892.

Elles sont loin toutefois d'avoir disparu complètement. En 1890, le choléra avait disparu de Saint-Petersbourg depuis le mois de janvier. Or, à cette date, et jusqu'en juin, où de nouveaux le choléra fut dépisté bactériologiquement, on reçut dans les hôpitaux un nombre de gastro-entérites aiguës causant parfois la mort et de plus en plus nombreuses. Dans aucun de ces cas on ne put isoler de bacilles virgules, ou si l'on parvint à en trouver, ils ne furent jamais agglutinables. En juin, d'ailleurs, cette épidémie de diarrhées aiguës continua d'évoluer à côté de celle de choléra, si bien que l'on eut, pour 1910, 1819 cas de gastro-entérite pour 4.600 cas de choléra.

Il est bien difficile devant ces faits de ne pas penser qu'une partie au moins de ces gastro-entérites n'étaient pas des cas de choléra.

D'autres constatations ont été faites en 1908, à Manille, et en 1911 à Alexandrie. Dans la première de ces villes, Mac Laughlain a trouvé, sur 376 personnes exposées au contagement cholérique, 27 porteurs de bacilles virgules et 46 porteurs de vibrions non spécifiques. Dans la deuxième, sur 5.050 personnes arrivant de contrées infectées,

on décela 12 porteurs de vibrions de Koch contre 14 de vibrions non spécifiques.

Si nous revenons au travail de Kolle et Gotschlich, déjà cité, sur les 77 vibrions isolés par eux en 1902 en Egypte, 18 n'étaient pas spécifiques; or, ils provenaient de 14 personnes ayant subi des atteintes mal caractérisées de choléra ou ayant été exposées à la contamination. Sur ces 14 individus, les auteurs, à l'aide d'enquêtes, établirent que 5 étaient sûrement des cholériques, 5 probablement pas; quant aux 4 derniers, les renseignements n'étaient pas suffisants pour exprimer une opinion quelconque.

Voilà donc des cas où, sur un certain nombre de personnes ayant fait partie de l'entourage d'un malade ou provenant d'un pays où régnait le fléau, on trouve plus de porteurs de vibrions non cholériques que de porteurs de vibrions de Koch.

On a tenté d'expliquer ces faits qui tendraient à infirmer en partie ce que nous avons dit des réactions précédentes.

Pour Kolle et Gotschlich, les résultats obtenus dans les cas cités plus haut sont dus à des vices de technique : au moment des prélèvements faits sur les cultures en plaques, l'opérateur s'est adressé à des colonies d'espèces banales coexistant avec les colonies spécifiques.

Pour remédier à ces accidents, il suffirait de toujours faire un nombre de prises assez grand pour augmenter les chances de rencontrer une colonie de bacilles virgules. Si cette recherche persistait à être négative, il conviendrait alors de se rendre compte de l'action du sérum du malade sur les bactéries isolées de ses fèces et, par

là, de savoir si ces dernières ont été l'agent causal de son infection.

D'ailleurs, l'agglutination étant une propriété biologique des microbes, doit être sujette, comme la plupart de leurs autres caractères, à des variations dont nous ne connaissons pas encore les facteurs, mais il est très possible qu'elle disparaisse alors que subsiste encore le pouvoir pathogène.

L'instruction du Ministère de l'Intérieur français en 1910 semble bien avoir envisagé cette hypothèse, lorsqu'elle dit : « On a attiré l'attention sur le fait qu'un certain nombre de vibrions n'agglutinent pas ou agglutinent mal au moment où ils viennent d'être isolés de l'organisme ou des eaux, et qu'ils n'acquièrent cette propriété qu'après un certain nombre de passages quotidiens sur milieux artificiels. Il serait bon, le cas échéant, de répéter chaque jour l'agglutination, et en attendant de considérer comme cholérique tout vibrion isolé d'un cas cliniquement caractérisé et répondant aux autres caractères bien connus du vibrion cholérique. »

Zlatogaroïff confirme cette théorie. Il examine les fèces de 1.540 personnes, soit convalescentes, soit ayant couru des risques de contagion. 82 fois il isole des vibrions non agglutinables; 55 subissent des traitements appropriés qui arrivent à rendre l'agglutinabilité à 45 d'entre eux. Il a les mêmes résultats avec des vibrions retirés des eaux.

Aujourd'hui, d'ailleurs, il est de notion courante que le passage d'un vibrion dans l'eau lui fait perdre son agglutinabilité.

Il faut donc, lorsqu'on se trouvera en présence de vi-

brions non agglutinables, ne pas repousser d'emblée l'idée de choléra, mais émettre des doutes, jusqu'à ce qu'on soit arrivé, par une technique appropriée, à isoler le vibron avec tous ses caractères spécifiques.

Cependant, il est bien évident que certains cas de diarrhées plus ou moins cholériformes ne seront dus en rien au bacille virgule. Les découvertes de vibrions dans des cas d'entérite, de dysenterie, deviennent de plus en plus nombreux.

Il suffit de relire le compte rendu des recherches de Ruffer, à Tor, en 1897, de Goltschlich au même lazaret, en 1905, 1906, 1907, pour se rendre compte d'une relation indéniable de cause à effet entre les vibrions et les diarrhées de formes diverses.

En France, Metchnikoff reproduit chez l'homme et le jeune lapin une attaque typique de choléra par absorption d'une culture d'un vibron, isolé par Sanarelli d'une fontaine publique de Versailles, ne donnant pas la réaction d'agglutination et ne pouvant par aucun de ses caractères être assimilé au vibron de Koch. Une expérience analogue faite avec un autre vibron isolé par le même auteur des eaux de la Seine à Saint-Cloud, donne les mêmes résultats.

En résumé, des vibrions plus ou moins différents du vibron cholérique sont susceptibles de donner naissance à des syndromes rappelant de très près le choléra; mais jamais ces diarrhées n'ont pu prendre l'allure épidémique en l'absence du vibron spécifique décrit par Koch.

En réponse à la deuxième question, nous exposerons tout d'abord la découverte des vibrions connus dans la

science sous le nom de vibrions d'El Tor et nous résumerons ensuite les recherches auxquelles ils ont donné lieu.

En 1897, Ruffer isole dans 5 cas typiques de colite et de dysenterie, sans aucun symptôme rappelant le choléra, des vibrions offrant tous les caractères du bacille virgule.

En 1905, Gotschlich, au lazaret d'El Tor, pendant une épidémie de dysenterie, examine le contenu intestinal de 107 pèlerins qui venaient de mourir. Rien à l'autopsie ne pouvait faire penser au choléra. Cependant 6 fois il découvre des vibrions agglutinables à une dilution assez forte et donnant le phénomène de Pfeiffer.

De même, en 1906 et 1907, le même auteur isole encore 3 vibrions présentant les mêmes caractères que ceux de l'année précédente.

Or, pendant aucune des quatre années énumérées ci-dessus, on n'avait entendu parler de choléra, ni aux Lieux-Saints, ni à El Tor; et pourtant ce que nous avons dit plus haut des réactions du vibrion de Koch tendrait à faire considérer ces vibrions d'El Tor comme de vrais vibrions cholériques.

Pour résoudre le problème, posé en ces termes, les bactériologistes se sont adressés à trois ordres de faits que nous étudierons les uns après les autres : l'hémolyse; la déviation du complément; la sécrétion de toxines.

L'hémolyse. — Pour se rendre compte du peu de valeur diagnostique de ce phénomène, il suffit de se reporter à un chapitre antérieur. Si les vibrions d'El Tor sont hémolytiques, certains vibrions cholériques le sont tout aussi nettement. Certains de ces vibrions hémolytiques, mais non tous, se prêtent à la fabrication d'hémolysines

solubles, qui, jouant le rôle d'antigène, peuvent donner naissance à des sérums antihémolytiques.

Les chercheurs se sont tournés de ce côté et ont tenté de différencier les vibrions par l'action de leurs sérums antihémolytiques sur leurs hémolysines, mais aucun résultat n'a été encore obtenu en ce sens.

La déviation du complément. — Il ne nous appartient pas de présenter dans ce travail les différentes théories proposées pour expliquer ce phénomène, ni de mettre en relief son importance. Nous voulons simplement exposer de quelle manière on l'a adaptée à la diagnose du vibron cholérique et les renseignements que l'on a pu en tirer.

On prépare des sérums privés d'alexine en chauffant une demi-heure à 56° un immun-sérum à titre agglutinant élevé (1/4000 environ) et un sérum normal de même espèce (en général on choisit le lapin, ou le cheval si on a besoin de grandes quantités de sérum). L'alexine thermolabile est détruite. Pour la remplacer, on prend du sérum frais de lapin ou de cobaye.

L'émulsion microbienne est représentée par le délayage dans 2 cc. d'eau physiologique de la culture entière d'un tube de gélose, âgée de dix-huit heures.

Le système hémolytique se compose du mélange de 1 volume de globules rouges de mouton lavés et de 2 volumes de sérum de lapin antimouton, privé également d'alexine par chauffage d'une demi-heure à 56°.

On prend alors trois tubes que l'on remplit :

Le premier avec :

- 0 cc. 2 d'émulsion de vibrions cholériques;
- 0 cc. 6 d'immun-sérum;
- 0 cc. 1 de sérum de cobaye (alexine).

Le deuxième avec :

0 cc. 2 d'émulsion de vibrions cholériques;

0 cc. 6 de sérum normal;

0 cc. 1 de sérum de cobaye.

Le troisième renfermera le même mélange que le premier.

On maintient ces tubes pendant quatre ou cinq heures à la température du laboratoire en agitant de temps en temps.

Passé ce délai, on ajoute à chacun des deux premiers tubes une goutte de la dilution de globules dans le sérum antimouton dont on a fait disparaître l'alexine; le troisième reçoit une goutte d'une dilution de globules dans l'eau physiologique. On abandonne de nouveau à la température du laboratoire, et on examine au bout de trois heures; si le vibron suspect est bien cholérique, l'hémolyse n'aura pas lieu dans les tubes I et III, mais se fera dans le tube II.

Si le vibron envisagé possède lui-même un pouvoir hémolytique marqué, l'hémolyse aura lieu dans I et III, mais tardivement, après douze ou dix-huit heures, par exemple.

Pour éviter toute cause d'erreur on peut déterminer les quantités nécessaires de chaque élément par un essai préliminaire, effectué à l'aide d'un vibron cholérique authentique : en effet, les sérums sont plus ou moins riches en alexine, des cultures de même âge sont plus ou moins riches en microbes, d'où des conclusions fausses tirées d'une réaction correctement exécutée.

Avec la technique que nous venons d'énoncer, Crendiropoulo a examiné 42 vibrions au point de vue des quatre

réactions : d'agglutination, de Pfeiffer, de Bordet-Gengoux, et d'hémolyse, et il a pu diviser ces 42 vibrions en quatre groupes :

	R. d'ag- glut.	R. de Pfeiffer	R. de Bordet- Gengoux	Hémolyse
Groupe I.	—	—	—	—
(12 vibrions)	+	+	+	—
Groupe II.				
(6 vibrions El Tor 1905)	+	+	—	+
Groupe III.				
(14 vibrions)	—	—	+	+
Groupe IV.				
(10 vibrions)	—	—	—	+

On remarque d'abord que certains vibrions (groupe III) ne donnant aucune des deux premières réactions dévient cependant le complément en présence d'un immun-sérum cholérique; mais nous manquons de renseignements plus complets à ce sujet.

On voit aussi, en deuxième lieu, que les vibrions d'El Tor (II) se distinguent très catégoriquement des vibrions agglutinables du groupe I : ils ne seraient donc pas cholériques.

MM. Betsche et Kohn, qui renouvellent ces expériences avec divers vibrions, contredisent cette opinion et observent la déviation du complément en faisant réagir de l'immun-sérum cholérique sur un vibron d'El Tor et en faisant réagir de l'immun-sérum d'El Tor sur un vibron cholérique.

Neufeld et Haendel soutiennent aussi le même avis. Cette méthode, à moins que les divergences des auteurs précités ne tiennent à des différences de technique, ne peut donc encore nous donner la solution du problème des vibrions d'El Tor.

La sécrétion des toxines. — Pfeiffer, se basant sur les insuccès des recherches d'une toxine soluble dans les cultures du bacille virgule, avait cru à l'existence d'une endo-toxine qu'il avait cru pouvoir isoler par macération et destruction du corps des microbes et qui résistait assez bien à un chauffage d'une heure à 60°.

En 1896, Metchnikoff, Roux et Salimbeni, avaient cependant réussi à mettre en évidence, dans les cultures, une toxine soluble sécrétée par le vibron de Koch, et analogue aux toxines diphtériques et tétaniques, supportant sans atténuation sensible l'ébullition; elle s'altère au contact de l'air et de la lumière, mais résiste en tubes scellés.

Brau et Denier isolent des toxines semblables entre elles et identiques à celles des auteurs ci-dessus.

Ces toxines, à doses élevées, foudroient le cobaye en quelques minutes. Leur injection par petites doses, de même que l'injection de cultures vivantes vaccinent les animaux et donnent naissance chez eux à des sérums antitoxiques.

Kraus, dans les cultures d'un vibron (vibron de Nasik) isolé dans les fèces d'un cholérique authentique, mais non cholérique lui-même (parce qu'il ne donne pas l'agglutino-réaction), a mis en évidence une toxine et une hémolysine solubles. En partant de cette toxine, il a réussi à immuniser les animaux.

Les vibrions d'El Tor (Kraus et Pribram) donnent également une toxine thermolabile dont l'action sur le lapin est aussi rapide que l'action de la toxine du vibron de Nasik, et une hémolysine détruite par la chaleur.

Le sérum antitoxique d'El Tor neutralise la toxine

Nasik et le sérum antitoxique Nasik neutralise la toxine El Tor. Cependant les deux vibrions Nasik et El Tor ne sont pas semblables car le sérum antitoxique obtenu par inoculation du premier est inactif envers la toxine du vibron de Saïgon, cholérique vrai, alors que le sérum El Tor la neutralise. Le sérum Saïgon est lui-même inactif envers les toxines Nasik et El Tor.

Enfin, on a remarqué (Huntemüller) que certains vibrions de Koch (vibron 70 de la collection de Berlin), donnaient naissance à des toxines et à des hémolysines semblables à celles du vibron d'El Tor. Les sérums obtenus avec eux réagissent sur les toxines El Tor et réciproquement.

Une première notion, qui se dégage tout d'abord de ces faits, c'est l'existence de deux sortes de toxines sécrétées par les vibrions cholériques : l'une thermostable (endo-toxines de Pfeiffer, Kohn, Roux, Metchnikoff, Brau, Denier), l'autre thermolabile, accompagnée en général d'une hémolysine à action puissante (toxines des vibrions de Koch et d'El Tor).

Quant à l'identification du vibron d'El Tor, les recherches sur les toxines et les sérums antitoxiques sont encore incapables de nous fournir des données certaines à son sujet. D'une part, en effet, il se rattache à certains vibrions cholérique (vibron Saïgon, vibron 70), d'autre part il se rapproche plutôt, par ses hémolysines du vibron non cholérique, comme le vibron Nausun.

A la suite de ces discussions, tout ce que nous pouvons dire, c'est que la découverte en dehors de toute manifestation cholérique de vibron donnant les réactions d'agglutination et de Pfeiffer doit être interprétée prudem-

ment et faire porter sous toutes réserves le diagnostic d'infection cholérique.

Pour terminer, nous rapporterons brièvement une observation des plus probantes de Crendiropoulo et de M^{me} Panayotatou :

Un malade venant d'une province de l'Egypte, où ne s'est produite aucune manifestation cholérique depuis 1902, arrive à Alexandrie pour faire soigner une diarrhée bilharzienne datant de trois ans. On isole dans ses fèces deux vibrions monociliés, donnant la réaction de Pfeiffer, agglutinant l'un à 1/2000, l'autre à 1/500 avec un sérum actif à 1/3000. La déviation du complément est positive pour l'un, négative pour l'autre. Aucun d'eux n'est hémolytique. Le sérum du malade n'agglutinait ni des vibrions cholériques authentiques, ni les vibrions de ses selles, et ne donnait pas le phénomène de Pfeiffer. Il n'avait donc subi aucune atteinte, comme en témoignait le manque des réactions d'immunité dans son sang. La région où demeurerait cet individu était indemne depuis 1902 et, au cours de l'enquête, on ne put découvrir aucune relation entre lui et, soit des convalescents, soit des porteurs de germes. Porteur de vibrions à caractères cholériques, malgré une diarrhée qui mettait son intestin en état de moindre résistance, il n'a pas eu le choléra.

CHAPITRE V

Le séro-diagnostic du choléra.

A côté des réactions d'immunité obtenues en partant des vibrions isolés des fèces, le séro-diagnostic du choléra est possible, en recherchant l'activité agglutinative et bactériolytique du sérum des malades vis-à-vis des vibrions spécifiques.

Dès 1897, Achard et Bensaude avaient proposé cette méthode pour le diagnostic précoce du choléra, prétendant que dans plus de 90 p. 100 des cas le sérum des cholériques, dès le début de la maladie, était capable d'agglutiner le vibron de Koch en moins d'une heure, à une dilution de 1/10 à 1/15.

D'après des recherches ultérieures, il semble bien que cette propriété n'apparaisse que tardivement dans le sang des personnes atteintes et soit d'ailleurs inconstante.

Par contre, sa persistance, pendant un temps assez long après la guérison, présente une certaine importance en ce sens qu'elle permettra de porter un diagnostic rétrospectif et parfois aussi de retrouver les cas souvent méconnus, reliant un foyer épidémique à un autre, ou ayant apporté le fléau dans une région indemne jusqu'alors.

En 1905, Gaffky examinant 14 échantillons de sang de malades ayant présenté des troubles d'origine incertaine, a pu affirmer 7 fois une atteinte cholérique alors qu'on n'avait pu isoler aucun vibrion des fèces.

Il remarqua que pour ce genre de recherches, la réaction de Pfeiffer était supérieure à l'agglutino-réaction, celle-ci n'ayant lieu qu'à des dilutions de 1/50, alors que la première existait encore à des dilutions variant de 1/200 à 1/500.

Svenson confirme cette opinion. Sur 27 examens de sang de malades ayant du vibrion de Koch dans leurs selles, il trouve, en effet, 21 résultats positifs avec l'épreuve de Pfeiffer, alors que 6 fois seulement l'agglutino-réaction avait lieu à des dilutions supérieures à 1/50.

Van Loghen a appliqué le séro-diagnostic au sang de 4 porteurs sains décelés parmi 298 individus examinés par lui à Rotterdam. Il a choisi une culture dont une anse tuait le cobaye en vingt-quatre heures. Des doses variant de 0 gr. 05 à 0 gr. 250 de sérum d'homme normal n'étaient pas capables de préserver le cobaye et ne donnaient pas le phénomène de Pfeiffer, alors que 0 gr. 005 de sérum de bacillifère sauvaient l'animal inoculé et donnaient la bactériolyse.

Il concluait donc que chez les porteurs de vibrions dits sains avaient lieu des infections suffisantes pour donner naissance à des anticorps dans leur sang, mais trop légères pour avoir attiré leur attention.

CONCLUSIONS

I. — Pour le diagnostic bactériologique du choléra, on peut adopter la technique suivante, donnant des résultats précis dans un délai de vingt-quatre à trente-six heures :

1° S'il existe des selles riziformes, prendre un flocon muqueux et l'examiner au microscope en goutte pendantes ou en préparations colorées.

2° Isoler le vibrion :

a) Si l'on a des matières suspectes, représentant des cultures très-abondantes de vibrions, ensemercer directement sur gélose alcalinisée et sur milieu de Dieudonné, un grain riziforme ou une quantité équivalente de fèces;

b) Dans tous les cas, faire des cultures d'enrichissement avec 1 cc. de matières dans 50 cc. d'eau peptonée; après un séjour de six heures à l'étuve à 37° ou parfois de douze à dix-huit heures, prélever des anses de cultures et ensemercer sur gélose ordinaire et milieu de Dieudonné;

c) Par essai d'agglutination en gouttes, rechercher parmi les colonies celles pouvant appartenir au vibrion de Koch. On réalisera alors des cultures pures.

3° Identifier le vibron :

a) Par la réaction d'agglutination qui doit avoir lieu avec une dilution d'au moins 1/1000 en employant un sérum d'activité égale ou supérieure à 1/4000;

b) Par la réaction de Pfeiffer.

II. — Pour les premiers cas suspects, il est préférable de caractériser les vibrions trouvés par l'emploi des deux réactions. Une fois la notion d'épidémie acquise, la réaction d'agglutination pourra suffire pratiquement pour porter le diagnostic de choléra, si les malades à examiner présentent une affection cholériforme avec gastro-entérite.

III. — Si, par hasard, se manifestaient des cas typiques de choléra, bien caractérisés à l'autopsie, et si l'examen bactériologique des fèces montre une flore vibrienne cholériforme, on doit soupçonner le choléra, même si les vibrions ne sont pas agglutinables au titre indiqué plus haut.

En ce cas, il faut répéter les recherches jusqu'à ce que le diagnostic soit complètement précis.

IV. — On peut trouver des personnes ne présentant aucun symptôme cholériforme ou des personnes atteintes d'une autre maladie, qui permettent cependant de déceler dans leurs selles des vibrions donnant l'agglutino-réaction et la réaction de Pfeiffer. Ce sont des porteurs de germes, aussi dangereux, sinon plus, que des cholériques vrais.

V. — Les connaissances bactériologiques actuelles ne nous permettent pas de faire des vibrions cholériques une

classification en vibrions pathogènes et en vibrions inof-
fensifs, comme le vibrion d'El Tör.

VI. — On peut porter un diagnostic rétrospectif de
choléra en constatant dans le sérum d'un individu conva-
lescent ou même en bonne santé l'existence des réactions
d'agglutination et de Pfeiffer.

Vu :

Le Président de la Thèse,

J. COURMONT.

Vu :

Le Doyen,

L. HUGOUNENQ.

VUET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 11 décembre 1911.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

P. JOUBIN.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARD et BENSAUDE. — Séro-diagnostic du choléra asiatique. *Presse médicale*, 26 septembre 1896 ; *Soc. méd. des Hôp.*, 25 avril 1897.
- BENSAUDE. — Th. de Paris, 1897.
- BOSSAERT. — Etude sur l'agglutination comparée du vibrion cholérique et des microbes voisins par les sérums spécifiques et les substances chimiques. *Ann. Inst. Pasteur*, XII, 1898.
- BRAUN. — Ueber die Agglutination von Cholera-vibrien durch normale Rinderserum. *Arch. für Hyg.*, t. LXVIII, f. 2, pp. 95 et 116.
- BUJWID. — Ein chemische Reaktion für die Cholera bacterien. *Zeitschr. für Hyg.*, t. II, 1887, p. 52.
- COURMONT. — Cours d'hygiène, 1909-1910.
— Bactériologie pratique, 1911.
- CRENDIROPOULO et miss SHELDON AMOS. — Further observations on the influence of calcium chloride on the agglutination of vibron. *Scientific Reports*, by members of the Medical Staff. Alexandrie, 1906.
- DEYCKE. — Elektive Nährboden für Cholera-bacillen. *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1903, n° 37.
- DUNBAR. — Zu bakteriologischer Cholera Diagnose. *Berliner Klinische Woch.*, 25 sept. 1905.
- ELSNER. — Zur Plattendiagnose des Cholera-vibrio. *Arch. für Hyg.*, XXI, 1894, p. 123.
- FINKLER-PRIOR. — Forschungen ueber Cholera-bacterien. Bonn, 1885.
- HANDEL et WOITHE. — *Arb. aus d. Kais. Gesundh. Anst.*, t. XXXIV, J., 1^{er} mars 1910.
- KOLLE et GOTSELICH. — *Zeitsch. f. Hyg.*, t. XLIV, f. I, 18 mars 1903.
- KRAUS et FUKUHARA. — Weitere Beiträge zur Differenzierung des Cholera-vibrio von anderen Vibrionen, mittels der Kæmotoxine. *Zeitschr. für Immunitäts forsch.*, I, Orig., t. III, 13 juillet 1909, pp. 33-27.

- MAC LAUGHLAIN et WITMORE. — *The Philip. Journ. of Sc.*, vol. V, n° 4, oct. 1910.
- METCHNIKOFF. — Recherches sur le choléra et les vibrions. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 403; *Ann. Inst. Past.*, 1894, VIII, p. 529.
- NEDRIGAILOFF. — La méthode de fixation d'alexine appliquée à l'examen des matières cholériques. *Journ. de méd. de Kharkoff*, t. VII, n° 5, 1909, pp. 360-381.
- NEUFELD et WOLTHE. — Ueber elektive Nährboden insbesondere den Dœudonneschen Agar. *Arb. a. d. kais. Gesundh.*, t. XXXIII, f. 3, fév. 1910, p. 605.
- PFEIFFER. — Nouvelles recherches sur l'existence de l'immunité cholérique et sur les processus bactéricides spécifiques. *Zeitschr. für Hyg.*, XVIII, 1894, p. 1.
- Sur le diagnostic différentiel du vibron cholérique par les réactions d'immunité. *Zeitschr. für Hyg.*, XIX, 1894, p. 75.
- PICOT. — Diagnostic clinique et bactériologique du choléra. Thèse Paris, 1909.
- POTTEVIN. — Rapport sur le diagnostic bactériologique du choléra au Comité permanent de l'Office international d'hyg. publique, octobre 1911.
- RUFFER. — Scientific reports by members of the Medical Staffs. Alexandrie, 1906.
- SANARELLI. — Vibrions des eaux et étiologie du choléra. *Ann. Inst. Past.*, VII, 1893.
- STRONG. — *The Philip Journ. of Sc. B.*, I, IV.
- SVENSON. — Agglutininie und Bakteriolyse im Blut von Cholera-kranken. *Zeitschr. für Hyg.*, t. LXIV, f. 3, 22 décembre 1909, p. 342.
- TOBEY. — The methods for testing the indol reaction. The cholera red reaction and the indol reaction. *Journ. of med. Research*, t. XV, f. 3, pp. 301, 304, 305 et 307.
- WRETOWSKI. — Sur le diagnostic bactériologique du vibron cholérique. *Gazeta lekarska*, t. XXV, n° 10, 1911.
- ZLATOGAROFF. — Zur Frage der Diagnostik der Choleravibrionen. *Centralbl. für Bakteriol.*, I, Orig., t. XLVIII, 8 janvier 1909, pp. 684, 697.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	5
CHAPITRE I. — Isolement du vibron cholérique et son obtention en cultures pures	7
CHAPITRE II. — Identification du vibron cholérique par les caractères morphologiques biochimiques et d'inoculation. .	14
CHAPITRE III. — Identification du vibron cholérique par les réactions d'immunité.	21
CHAPITRE IV. — Valeur des réactions d'immunité au point de vue de l'identification absolue du vibron cholérique	35
CHAPITRE V. — Le séro-diagnostic du choléra.	47
CONCLUSIONS	49
BIBLIOGRAPHIE	53
TABLE DES MATIÈRES	55
